

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月25日 (25.05.2001)

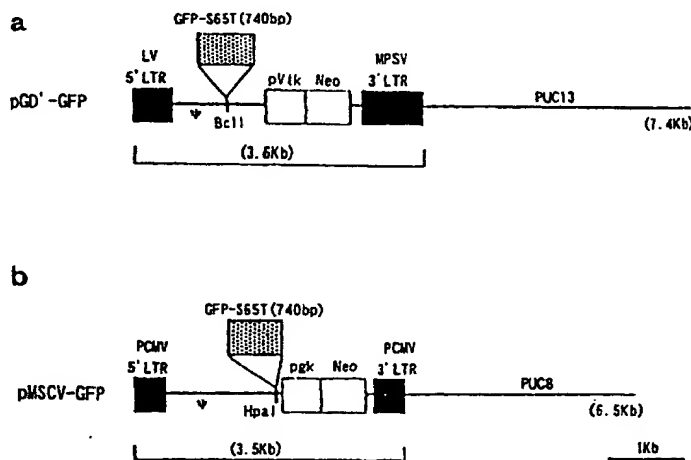
PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/35733 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, (72) 発明者; および
A61K 48/00, C12N 15/86 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高浜洋介 (TAKA-
HAMA, Yousuke) [JP/JP]; 〒779-3118 徳島県徳島市国
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06379 府町井戸字北屋敷45番1号 Tokushima (JP).
(22) 国際出願日: 2000年9月19日 (19.09.2000) (74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502
(25) 国際出願の言語: 日本語 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, US.
(30) 優先権データ: 1999年11月15日 (15.11.1999) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
特願平 11/324771 DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術 添付公開書類:
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY — 国際調査報告書
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
町四丁目1番8号 Saitama (JP). 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ACQUIRING IMMUNOLOGICAL TOLERANCE

(54) 発明の名称: 後天的免疫寛容の獲得方法



(57) Abstract: A method of acquiring immunological tolerance to a foreign DNA such as a vector carrying a foreign gene integrated thereto or its expression product whereby the foreign DNA or its expression product can be recognized not as nonself but as self; a method of sustaining a gene therapeutic effect whereby a rejection to a foreign DNA such as a vector carrying a foreign gene integrated thereto or its expression product can be avoided; and a non-human animal which has acquired immunological tolerance to a foreign DNA such as a vector carrying a foreign gene integrated thereto or its expression product. Immature T lymphocytes having a foreign DNA (for example, a virus vector carrying a foreign gene integrated thereto) transferred thereto are introduced into the thymus and the above foreign DNA is expressed in the thymus organ. The foreign DNA as described above can be transferred into the immature T lymphocytes by, for example, cocultivating the immature T lymphocytes with virus producer cells infected with a virus vector.

[続葉有]

明 細 書

後天的免疫寛容の獲得方法

5 技術分野

本発明は、幼若Tリンパ球を介する胸腺へのDNA導入による、ウイルスベクター由来成分等の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、遺伝子治療における外来性DNA及び／又はその発現産物に対する拒絶応答を回避する遺伝子治療効果の持続方法や、ウイルスベクター由来成分等の外来性DNA及び／又はその発現産物に対して後天的免疫寛容を獲得したマウス等の非ヒト動物に関する。

背景技術

15 生体は一般に自己を構成する抗原に対しては免疫応答を示さない。これは自然ないし先天的免疫寛容と呼ばれている。一方、本来異種の抗原であっても投与の時期（特に胎生期ないし新生期）、投与の方法（たとえば免疫抑制剤を用いるとか）、投与するときの性状（タンパク質抗原なら変性物を除いて投与する）によっては、その後の免疫応答に対して反

20 性を示さない状態を誘導できる。これは、後天的ないし獲得寛容と呼ばれている。また、免疫応答とは、一般に自己と自己以外のもの（非自己）とを識別し、非自己に対して細胞性や体液性の反応を起こしたものと捉えられている。この識別は、リンパ球表面にある抗原受容体によって行われ、非自己と認識した場合には、リンパ球が増殖して細胞傷害性を発

25 揮したり抗体を産生するようになる。しかし、リンパ球による認識の最初の段階では、まず、樹状細胞やマクロファージが異物（非自己）を取

一由来のペプチドを認識して感染細胞を殺し、ベクター（ウイルス）を排除してしまう。このように、現在の遺伝子治療においては、遺伝子導入そのものには成功しても、長期の持続性効果を得ることには再現よく成功していない欠点があった。

- 5 また従来、後天的免疫寛容の獲得方法に関して、脂溶性成分又は脂溶性成分含有物質を抗原と同時に摂取させないことにより哺乳動物に対して免疫寛容を誘導する方法（特開平 9 - 1 9 4 3 9 3 号公報）や、経口投与によって実質的に薬理効果を奏さず、注射によって薬理的効果を奏し、かつ注射による繰り返し投与によって薬理効果が発揮されなくなる薬物を有効成分とする医薬製剤であって、経口免疫寛容を誘導するのに十分な投与単位数の該薬物含有経口投与用製剤と、経口免疫寛容が誘導された後に投与するための該薬物含有注射用製剤とからなる医薬製剤を用いる方法（特開平 1 0 - 2 9 8 1 0 1 号公報）や、移植受け入れ患者に対応した特異的な免疫寛容を得た動物から臓器を摘出することにより、移植された臓器のリンパ球などで構成される末梢性免疫機構が、移植された後ヒトの組織適合抗原を攻撃せず、良好な臓器生着を有する人工臓器を用いて移植患者に免疫寛容を成立させる方法（特開平 9 - 1 8 7 4 7 0 号公報）が知られている。

【 0 0 0 6 】

- 20 【発明が解決しようとする課題】

F T O C（幼若胸腺組織培養）においてレトロウイルスを介して遺伝子を直接導入する方法や T リンパ球発達における M A P キナーゼの役割に関する情報が報告（Cell 86, 243-251, 1996）されており、従来も胸腺に遺伝子を導入しようとする試みがあったが、正常の実験動物において

25 も大変効率が悪く、既存の T リンパ球による排除作用を抑える効果に乏しく、そのため実用性に乏しかった（FASEB. J. 6, 2853-2858, 1992、

球への遺伝子導入テクニック (J. Immunol. 161, 2888-2894, 1998、
Immunity 9, 565-574, 1998) を用いてマウス幼若Tリンパ球に p G D -
G F P 遺伝子を導入し、かかる遺伝子導入細胞を G F P の発現による蛍
光染色を利用して精製し、正常のマウスのTリンパ球を一過性に抑制す
5 るため低線量の放射線を照射し、遺伝子導入幼若Tリンパ球を胸腺に移
入し、このマウスの放射線照射からの回復を持ってから、p G D - G F
P レトロウイルスを皮内や腹腔内に注射したところ、幼若Tリンパ球前
処理の効果で、マウス内で導入遺伝子 G F P の発現は長期間にわたり持
続していた。すなわち、抗ベクター免疫応答を回避させることができ、
10 持続的な遺伝子治療が可能になることを見い出し、本発明を完成するに
至った。

またこのとき、ベクター成分以外の外来分子に対する免疫応答は正常
に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遺
伝子治療用のベクターに対しての特異的免疫寛容が誘導されたことや、
15 他の臓器で遺伝子導入に用いるベクターをそのまま幼若Tリンパ球に発
現させることは問題なく可能であることがわかった。この方法を用いる
ことによって、自己・非自己の識別をもたらす中心臓器である胸腺に、
幼若Tリンパ球を介して効率よく遺伝子を導入することができ、胸腺氣
管内でのベクター成分の効率のよい発現と、それによる効率のよいTリ
20 ンパ球の自己寛容の成立がもたらされることがわかった。

すなわち本発明は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性 D N A を導
入することを特徴とする外来性 D N A 及び／又はその発現産物に対する
後天的免疫寛容の獲得方法（請求項 1）や、外来性 D N A が導入された
幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性 D N A を発
25 現させることを特徴とする請求項 1 記載の外来性 D N A 及び／又はその
発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項 2）や、外来性 D

方法（請求項 1 1）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 1 1 記載の遺伝子治療効果の持続方法（請求項 1 2）に関する。

- さらに本発明は、幼若 T リンパ球を介して胸腺へ外来性 DNA を導入
- 5 することを特徴とする外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 1 3）や、外来性 DNA が導入された幼若 T リンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性 DNA を発現させることを特徴とする請求項 1 3 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物
- 10 （請求項 1 4）や、外来性 DNA が、少なくともベクターを含む DNA であることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 1 5）や、ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 5 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 1 6）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 1 6 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 1 7）や、非ヒト動物が齧歯類に属する非ヒト動物であるこ
- 20 とを特徴とする請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 1 8）や、齧歯類に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 8 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 1 9）に関する。

25

図面の簡単な説明

等のウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター、酵母人工染色体(YAC)ベクター等のベクターを例示することができるが、ウイルス粒子として感染させた場合に形質転換効率が非常に高い点でウイルスベクター、特にレトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス等に由来するウイルスベクターを用いることが好ましい。これらウイルスベクターを用いる場合、該ウイルスベクターを予め宿主細胞に感染させ、ウイルスプロデューサー細胞として用いることが好ましい。

本発明において用いられる幼若Tリンパ球とは、抗原受容体及び機能的コレセプターCD4/CD8などを発現する成熟Tリンパ球になる前のTリンパ球をいい、例えば、成体胸腺リンパ球から分画・精製することにより、また胎生14～18日頃の胸腺葉から得ることができる。胎生14～15日頃の胸腺葉は、左右両葉が個別に心臓上方に存在し、透明感のある球体で周辺組織とは区別しやすく成熟Tリンパ球の混入がない点で、この時期の胸腺葉を用いることが好ましい。

本発明における外来性DNAを幼若Tリンパ球へ導入する方法としては、本発明者らが開発した遺伝子導入テクニック(J. Immunol. 161, 2888-2894, 1998、Immunity 9, 565-574, 1998)、例えば、幼若Tリンパ球とウイルスプロデューサー細胞を共培養し、ウイルスプロデューサー細胞よりも大きさが小さく、密集度が低いことを利用して、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球をフォーワード&サイドスキャッター(forward and side scatter)により分離し、蛍光活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若Tリンパ球を分離・精製する方法や、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリーセルソーターでGFP⁺CD45⁺細胞をソートすることにより遺伝子が導入された幼若Tリンパ球を、繊維芽細胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製する方法を用いることが、

するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (培養液の調製)

RPMI 1640 [最終濃度で、50 μ M の 2-メルカプトエタノール (シグマケミカル社製)、10 mM のヘペス (Gibco BRL 社製)、2 mM の L-グルタミン (Gibco BRL 社製)、1 \times 非必須アミノ酸 (Gibco BRL 社製)、1 mM のピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL 社製)、100 U/ml のペニシリン (Gibco BRL 社製)、100 μ g/ml のストレプトマイシン (Gibco BRL 社製) を含む培地] に、56℃ で 30 分間前処理をした 10% のウシ胎児血清 (FCS) を添加した培養液 (10% FCS-RPMI 1640 培地) を調製した。なお、実施例における操作はすべてクリーンフード内で無菌的に行った。

実施例 2 (マウス胎仔胸腺葉の採取)

妊娠日齢 15 ~ 16 日目のマウスを頸部切断により殺し、70% のエタノールでマウスの腹部を清拭した後、胎仔を子宮ごと 100 mm 無菌皿に取り出した。この子宮から胎仔を取り出して、実施例 1 の培地 20 ~ 30 ml の入った 100 mm 無菌皿に胎仔を移し、2 ~ 3 回静かに皿を回転させ洗浄して血液とその余の夾雑物を取り除いた。かかるマウス胎仔を顕微鏡下に置き、静かに胸部を切開して 2 つの胸腺葉を取り出し、ガーゼの上に置き血液を取り除き、マウス胎仔胸腺葉を採取した。

実施例 3 (培養ウェルの調製)

殺菌したヘリスタット (Helistat) スポンジ (Colla-Tec, Inc., Plainsboro, NJ 08536) の小片を 24 ウェルプレート (直径 16 mm、無菌) の培養ウェルに置き、実施例 1 の培地 1 ml を入れ、スポンジのなめらかな面を上に向け、無菌ポリカーボネートフィルター膜 (Costar, Nucleopore Corp. PC membrane, #110409, 直径 11.3 mm) をその上に

とNIH-3T3 (ATCC CRL-1658) のG418耐性細胞とをいっしょに1日間培養し、ウイルスの力価を測定し、 10^6 CFU/ml以上の力価を有するウイルスプロデューサー細胞（組み換えベクターをインフェクションしたGP+E-86細胞）を以下の実施例に用いた。

実施例7（ウイルス感染幼若Tリンパ球の作製）

- 上記実施例5によって得られた単細胞の幼若Tリンパ球浮遊液を最終的に $0.5 \sim 2 \times 10^4$ 個/ウェルとなるように96フラットウェルに分注し、さらにあらかじめトリプシン処理し、1日間培養した上記ウイルスプロデューサー細胞を1ウェルあたりに $2 \sim 5 \times 10^3$ 個加えて、これらをウェル内で混合した。この混合物を、最終濃度 $1 \sim 5$ ng/mlのマウスの組換えIL-7（インターロイキン7；Genzyme社製）、又はこれと最終濃度 $1 \sim 5$ ng/mlの幹細胞因子（SCF）の存在下において1～2日間培養した。その後、共培養した幼若Tリンパ球を静かにピペティングしながら回収した。幼若Tリンパ球はプロデューサー細胞よりも小さく、密集度が低いことを利用して、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球（図2のa部分）をフォーワード&サイドスキャッター（forward and side scatter）により分離（図2）、蛍光活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若Tリンパ球を分離・精製した。
- また、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリーセルソーターでGFP⁺CD45⁺細胞をソートすることにより、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球を、繊維芽細胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製した。

実施例8（遺伝子導入幼若Tリンパ球による導入遺伝子の発現）

- 正常なマウス（B6）のTリンパ球を一過性に抑制するために低線量の放射線を照射し、上記実施例7により得られた遺伝子導入幼若Tリン

産業上の利用可能性

本発明によると、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で上記外来性DNAを発現させることにより当該外来性DNAやその発現産物に対して後天的免疫寛容を獲得させることができ、また、かかる外来性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を回避させ、遺伝子治療の効果を長期間安定して持続して行うこともできる。さらに、本発明の外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物は、遺伝子治療等の研究開発に用い

5

10

ると極めて有用である。

導入することを特徴とする遺伝子治療効果の持続方法。

9. 遺伝子治療における外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で外来性DNAを発現させることにより、外来性DNA及び／又はその発現産物により惹起される免疫応答を回避することを特徴とする請求項8記載の遺伝子治療効果の持続方法。

10. 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項8又は9のいずれか記載の遺伝子治療効果の持続方法。

11. ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項10記載の遺伝子治療効果の持続方法。

10 12. ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項11記載の遺伝子治療効果の持続方法。

15 13. 幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

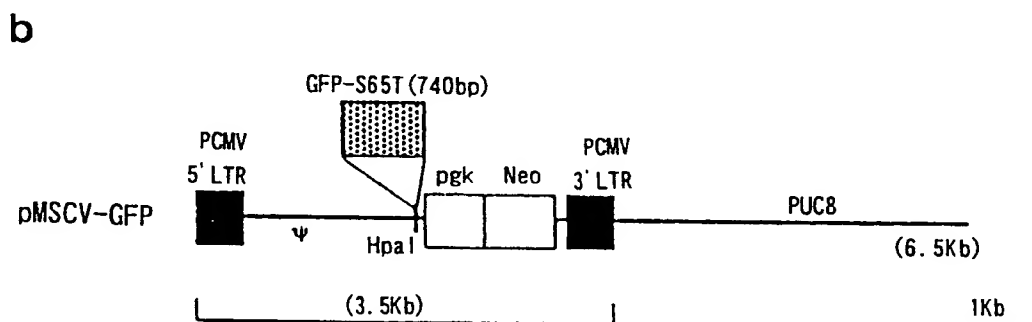
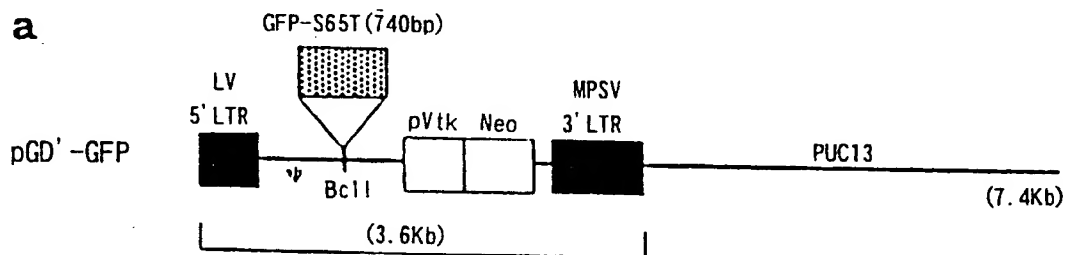
14. 外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項13記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

20 15. 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項13又は14記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

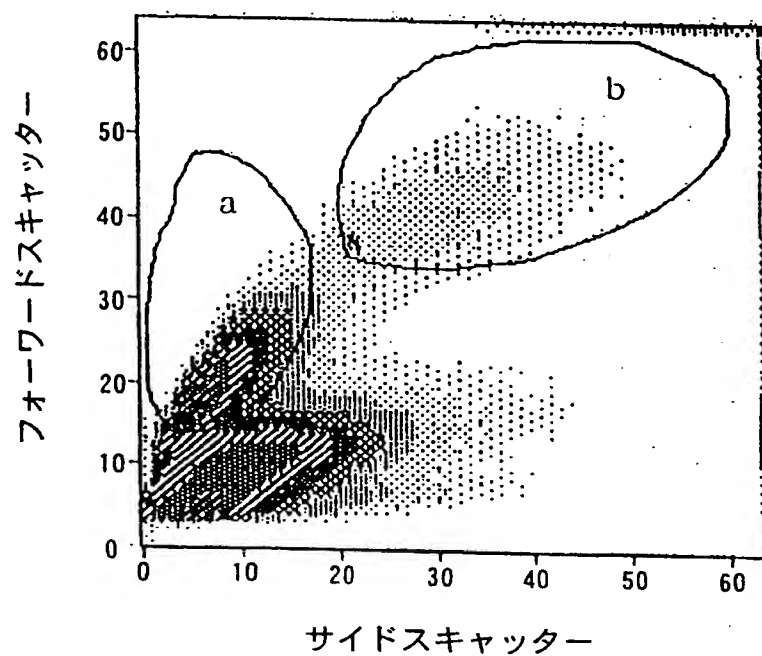
25 16. ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項15記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

17. ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレン

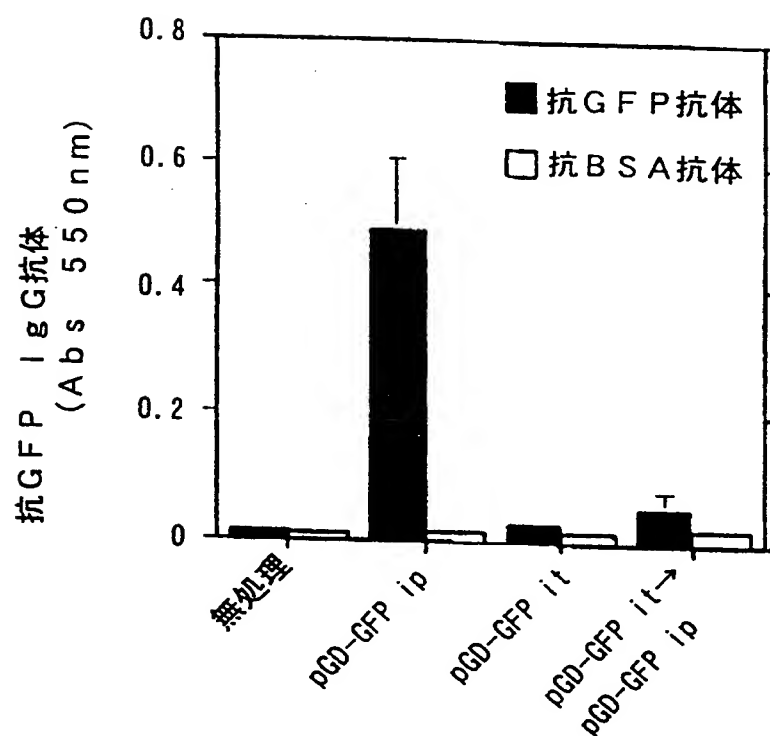
第 1 図



第 2 図



第 3 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06379

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sugawara T. et al., Journal of Immunology, vol.161, pp.2888-2894 (1998)	13-19
A	Hanazono Y. et al., Blood, vol.94 (7), pp.2263-2270 (Oct.1.1999)	13-19
A	Gu J. et al., Experimental Hematology, vol.24, pp.1432-1440 (1996)	13-19
A	Sharma S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.93, pp.11842-11847 (1996)	13-19
A	Evans G.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.95, pp.5734-5739 (1998)	13-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 December, 2000 (26.12.00)Date of mailing of the international search report
16 January, 2001 (16.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Sugawara T. et al., Journal of Immunology, vol.161, p.2888-2894 (1998)	13-19
A	Hanazono Y. et al., Blood, vol.94(7), p.2263-2270 (Oct.1.1999)	13-19
A	Gu J. et al., Experimental Hematology, vol.24, p.1432-1440 (1996)	13-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.12.00

国際調査報告の発送日

16.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 1-12 は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法であり、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06379

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sugawara T. et al., Journal of Immunology, vol.161, pp.2888-2894 (1998)	13-19
A	Hanazono Y. et al., Blood, vol.94 (7), pp.2263-2270 (Oct.1.1999)	13-19
A	Gu J. et al., Experimental Hematology, vol.24, pp.1432-1440 (1996)	13-19
A	Sharma S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.93, pp.11842-11847 (1996)	13-19
A	Evans G.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.95, pp.5734-5739 (1998)	13-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 December, 2000 (26.12.00)Date of mailing of the international search report
16 January, 2001 (16.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/06379

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Sugawara T. et al., Journal of Immunology, vol.161, p.2888-2894 (1998)	13-19
A	Hanazono Y. et al., Blood, vol.94(7), p.2263-2270 (Oct. 1. 1999)	13-19
A	Gu J. et al., Experimental Hematology, vol.24, p.1432-1440 (1996)	13-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.12.00

国際調査報告の発送日

16.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子



2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲1-12は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法であり、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 K01001PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06379	国際出願日 (日.月.年) 19.09.00	優先日 (日.月.年) 15.11.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01K 67/027, A61K 48/00, C12N 15/86

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Sugawara T. et al., Journal of Immunology, vol.161, p.2888-2894 (1998)	13-19
A	Hanazono Y. et al., Blood, vol.94(7), p.2263-2270 (Oct.1.1999)	13-19
A	Gu J. et al., Experimental Hematology, vol.24, p.1432-1440 (1996)	13-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.12.00

国際調査報告の発送日

16.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Sharma S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., vol. 93, p. 11842-11847 (1996)	13-19
A	Evans G.L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., vol. 95, p. 5734-5739 (1998)	13-19

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 1-12 は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法であり、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。